

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-009964

(43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

C12N 1/20  
// C12P 23/00  
(C12N 1/20  
C12R 1:01 )  
(C12P 23/00  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 06-152078

(71)Applicant : NIPPON OIL CO LTD

(22)Date of filing : 04.07.1994

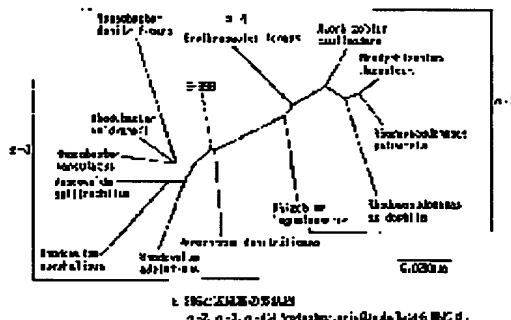
(72)Inventor : TSUBOKURA AKIRA  
YONEDA HISASHI  
TAKAGI MIKIHIRO  
KIYOTA TAKASHI

## (54) NEW MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new microorganism having specific properties, belonging to a new genus and capable of producing a carotenoid pigment.

CONSTITUTION: The objective new microorganism has the following properties. Form: polymorphic bacilli; mobility: positive; flagella: peripheric flagella; spore formation: none; Gram stainability: negative; pigment formation: positive (insoluble in water); oxidase: positive; catalase: positive; attitude toward oxygen: aerobic; glucose fermentation: negative; formation of 3-ketolactose: negative; quinone type: Q-10; the content of GC in intracellular DNA: 64-69mol%; slime formation: negative (glucose and sucrose); the presence of sphingolipid: negative; the presence of bacteriochlorophyll: negative. The bacterium is stipulated as the strain E-396 (FERM BP-4283) or the strain A-581-1 (FERM BP-4671) and capable of producing one or more carotenoid pigments selected from a group consisting of astaxanthine, adonixanthine,  $\beta$ -carotene, echinenone, canthaxanthine and zeaxanthine.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

17.08.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-9964

(43) 公開日 平成8年(1996) 1月16日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
// C 1 2 P 23/00		9452-4B		
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 23/00				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-152078

(22) 出願日 平成6年(1994) 7月4日

(71) 出願人 000004444

日本石油株式会社

東京都港区西新橋 1 丁目 3 番12号

(72) 発明者 坪倉 章

神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(72) 発明者 米田 久

神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(72) 発明者 高木 幹弘

神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外 3 名)

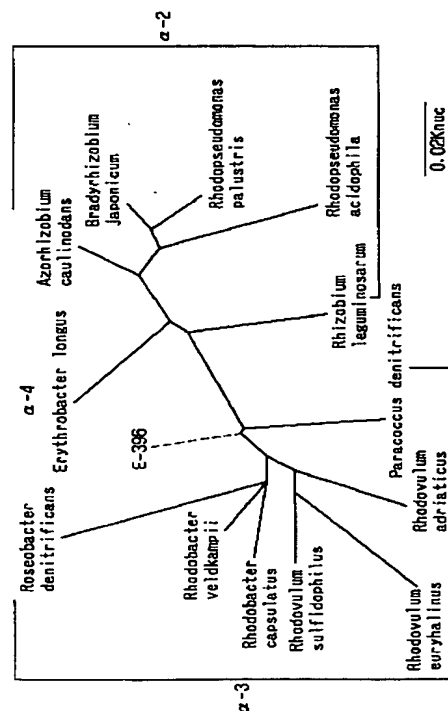
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物

(57) 【要約】

【目的】 カロチノイド色素を生産することができる、新規な属に属する細菌の提供。

【構成】 カロチノイド色素を生産することができ、図 1 に示す系統樹上の位置に存在する、新規な属に属する細菌。

E-396と近縁種の系統樹  
α-2, α-3, α-4はProteobacteriaのsubclassを被むす。

## 【特許請求の範囲】

## 【表1】

【請求項1】 次の性質：

① 形態	多形性の桿菌
② 運動性	有り
③ 鞭毛	周毛
④ 胞子形成	無し
⑤ グラム染色性	陰性
⑥ 色素の生成	陽性（非水溶性）
⑦ オキシダーゼ	陽性
⑧ カタラーゼ	陽性
⑨ 酸素に対する態度	好気性
⑩ グルコースの発酵性	陰性
⑪ 3-ケトラクトースの生成	陰性
⑫ キノン系	Q-10
⑬ 菌体内 DNAのGC含量	64～69モル%
⑭ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュクロース	陰性
⑮ スフィンゴ脂質の存在	陰性
⑯ バクテリオクロフィルの存在	陰性

を具備し、新属に属する細菌。

【請求項2】 アスタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロチン、エキネノン、カンタキサンチン及びゼアキサンチンから成る群から選択された少なくともいずれか1種のカロチノイド色素を生産することができる、請求項1に記載の細菌。

【請求項3】 前記細菌が生命工学工業技術研究所にFERM BP-4283として寄託されたE-396株または同研究所にFERM BP-4671として寄託されたA-581-1株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規な微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】カロチノイド色素を生産する細菌を天然から分離していた過程で、全く新規な微生物を分離することに成功し、さらにその微生物群は今までに報告され

ているどの属とも性質が異なる新属を形成することが確認された。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は新規な微生物を提供しようとするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、公知の属に属さない、すなわち新規な属に属する細菌株を見出し、本発明を完成した。したがって、本発明は新規な属に属する細菌を提供するものである。

【0005】

【具体的な説明】本発明の新規細菌は、次の性質を有する新規な属に属する細菌である。

【0006】

【表2】

① 形態	多形性の桿菌
② 運動性	有り
③ 鞭毛	周毛
④ 孢子形成	無し
⑤ グラム染色性	陰性
⑥ 色素の生成	陽性（非水溶性）
⑦ オキシダーゼ	陽性
⑧ カタラーゼ	陽性
⑨ 酸素に対する態度	好気性
⑩ グルコースの発酵性	陰性
⑪ 3-ケトラクトースの生成	陰性
⑫ キノン系	Q-10
⑬ 菌体内 DNAのGC含量	64~69モル%
⑭ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュクロース	陰性
⑮ スフィンゴ脂質の存在	陰性
⑯ バクテリオクロロフィルの存在	陰性

上記の性質を具備する細菌はバーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Systematic Bacteriology）、2巻、1984年を参照した結果、従来報告されているいずれの属にも該当しない新規な属の細菌群であると確認された。

【0007】好気性のグラム陰性の桿菌で運動性があり、しかもキノン系がQ-10である性質を有する属はプロテオバクテリア（Proteobacteria）の $\alpha$ -サブクラス（ $\alpha$  subclass）に属するアグロバクテリウム（Agrobacterium）属細菌あるいは光合成能を有する細菌であるロドシュードモナス（Rhodospseudomonas）属細菌、ロドバクター（Rhodobacter）属細菌、ロドブルム（Rhodovulum）属細菌、ロゼオバクター（Roseobacter）属細菌、エリスロバクター

（Erythrobacter）属細菌がある。

【0008】しかしながらアグロバクテリウムはスライムを形成するが本発明の微生物は形成しない点で異なる。よって本発明の微生物はアグロバクテリウムではない。また光合成能を有する上記の細菌はいずれもバクテリオクロロフィルを生成するが本発明の微生物は生成しない点から本発明の微生物は光合成細菌ではない。以上のように上記の性質を具備する細菌は新規な属に属する細菌と確認された。

【0009】具体的な微生物としてはE-396株を挙げることができる。この菌株は、発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成5年4月27日にFERM BP-4283として寄託された。この菌株は、次の菌学的性質を有する。

【0010】

【表3】

## (a) 形態的性質

## ① 細胞の形及び大きさ

桿菌、 $0.5\sim0.75\times1.0\sim5.0\ \mu\text{m}$

## ② 多形性

有り

## ③ 運動性

有り、周毛を有する

## ④ 孢子形成

無し

## (b) 培養的性質

## ① 肉汁寒天平板培養

円形でオレンジ色の光沢のある集落を形成する。

拡散性色素は生成しない。

## ② 肉汁液体培養

発育やや不良で全体に混濁し菌の沈澱あり。表面発育はない。

## ③ 肉汁ゼラチン穿刺培養

生育は不良でゼラチンを液化しない。

## ④ リトマス・ミルク

変化しない。

【0011】

【表4】

## (c) 生理学的性質

①	グラム染色性	陰性
②	硝酸塩の還元	陰性
③	脱窒反応	陰性
④	MRテスト	陰性
⑤	VPテスト	陰性
⑥	インドールの生成	陰性
⑦	硫化水素の生成	陰性
⑧	デンプンの加水分解	陰性
⑨	クエン酸の利用	
	Koser の培地	陰性
	Christensen の培地	陰性
⑩	無機窒素源の利用	
	硝酸塩	陰性
	アンモニウム塩	陽性
⑪	色素の生成	有り (非水溶性)
⑫	ウレアーゼ	陰性
⑬	オキシダーゼ	陽性
⑭	カタラーゼ	陽性
⑮	生育の範囲	
	(1) pH	pH 6 ~ pH 9 で生育 (最適: pH 7)
	(2) 温度	10℃ ~ 33℃ で生育 (最適: 28℃)
⑯	酸素に対する態度	好気性
⑰	O-Fテスト	酸化 (Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを 0.1% 添加した。)

【0012】

【表5】

## ⑬ 糖類からの酸およびガスの生成の有無

(Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを 0.1%添加した。)

	酸	ガ ス
(1) L-アラビノース	+	-
(2) D-キシロース	+	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	+	-
(5) D-フラクトース	-	-
(6) D-ガラクトース	+	-
(7) マルトース	+	-
(8) シュークロース	+	-
(9) ラクトース	+	-
(10) トレハロース	+	-
(11) D-ソルビトール	+	-
(12) D-マンニトール	+	-
(13) イノシトール	-	-
(14) グリセリン	+	-
(15) デンプン	-	-

【0013】

【表6】

(d) その他の生理学的性質

① エスクリン分解	陽性
② アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
③ 3-ケトラクトースの生成	陰性
④ PNPG	陽性
⑤ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュクロース	陰性
⑥ 資化性 (API 20NEキットによる)	
(1) グルコース	陽性
(2) L-アラビノース	陰性
(3) D-マンノース	陽性
(4) マンニトール	陽性
(5) N-アセチル-D-グルコサミン	陰性
(6) マルトース	陽性
(7) グルコン酸カリウム	陽性
(8) n-カプロン酸塩	陰性
(9) アジピン酸	陰性
(10) dl-リンゴ酸	陽性
(11) ケエン酸ナトリウム	陰性
(12) 酢酸フェニル	陰性

【0014】

【表7】

## (e) 化学分類学的性質

- |                        |       |
|------------------------|-------|
| ① 菌体内 DNAのGC含量 (HPLC法) | 67モル% |
| ② キノン系                 | Q-10  |
| ③ バクテリオクロロフィル          |       |
| 嫌気下での産生                | 生育せず  |
| 好気下での産生                | 陰性    |
| ④ スフィンゴ脂質の存在           | 陰性    |
| ⑤ 菌体脂肪酸組成              |       |

脂肪酸	割合 (%)
C 16 : 0	0.8
C 16 : 1	0.1
C 17 : 0	0.5
C 18 : 0	9.0
C 18 : 1	81.4
C 19 : 0	0.4
2-OH C 14 : 0	0.2
3-OH C 14 : 0	0.6

【0015】

【表8】

## ⑤ 近縁菌種との DNA-DNA 相同性 (HPLC法)

試 験 菌 株	相同値 (%)
<i>Flavobacterium okeanokoites</i> IFO 12536	2
<i>Flavobacterium resinovorum</i> ATCC 33545	23
<i>Flavobacterium aquatile</i> IFO 15052	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IFO 15193	0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> IFO 12532	7
<i>Mycoplana bullata</i> IFO 13290	32
<i>Mycoplana segnis</i> IFO 15250	26
<i>Mycoplana ramosa</i> IFO 15249	9
<i>Mycoplana dimorpha</i> IFO 13291	11
<i>Xanthobacter flavus</i> IFO 14759	24
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> IFO 13935	6

【0016】⑦16SリボソームRNAをコードするDNAの塩基配列  
配列番号：1に示す。以上の結果からE-396株 (FERM BP-4283) は下記の性質を具備する新属

に属する細菌であることが確認された。

【0017】

【表9】



① 形態	多形性の桿菌
② 運動性	有り
③ 鞭毛	周毛
④ 孢子形成	無し
⑤ グラム染色性	陰性
⑥ 色素の生成	陽性（非水溶性）
⑦ オキシダーゼ	陽性
⑧ カタラーゼ	陽性
⑨ 酸素に対する態度	好気性
⑩ グルコースの発酵性	陰性
⑪ 3-ケトラクトースの生成	陰性
⑫ キノン系	Q-10
⑬ 菌体内 DNAのGC含量	64~69モル%
⑭ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュークロース	陰性
⑮ スフィンゴ脂質の存在	陰性
⑯ バクテリオクロロフィルの存在	陰性

【0018】E-396株は好気性のグラム陰性の桿菌で周毛を有していることからアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属細菌と思われたが色素産生能とスライム形成能、およびDNA-DNA相同性の結果から否定された。また集落の色調からスフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属細菌や光合成細菌の可能性も考えられたが、スフィンゴ脂質およびバクテリオクロロフィルが検出されずいずれの属の菌株でもないことが分かった。

【0019】集落の色調、周毛、GC含量、キノン系からE-396株と近縁と推定される各菌種の保存菌株とDNA-DNA相同性を調べたが高い相同値を示した属は得られなかった。さらにE-396株の16Sリボソ

ームRNAの塩基配列から近隣結合法により分子系統樹 (図1) を作成した。その結果E-396株は近縁のいずれの属とも系統的に独立していることが分かった。よってE-396株は既知の属ではない全く新規な属に属する細菌であることが確認された。

【0020】さらに具体的な微生物としてはA-581-1株を挙げることができる。この菌株は、発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年5月20日にFERM BP-4671として寄託された。この菌株は、次の菌学的性質を有する。

【0021】

【表10】

## (a) 形態的性質

## ① 細胞の形及び大きさ

桿菌、 $0.5 \sim 1.0 \times 3.5 \mu m$

## ② 多形性

有り

## ③ 運動性

有り、周毛を有する

## ④ 孢子形成

無し

## (b) 培養的性質

## ① 肉汁寒天平板培養

円形でオレンジ色の光沢のある集落を形成する。

拡散性色素は生成しない。

## ② 肉汁液体培養

全体に湿濁し菌の沈澱あり。表面発育はない。

## ③ 肉汁ゼラチン穿刺培養

生育は不良でゼラチンを液化しない。

## ④ リトマス・ミルク

変化しない。

【0022】

【表11】

## (c) 生理学的性質

①	グラム染色性	陰性
②	硝酸塩の還元	陰性
③	脱窒反応	陰性
④	MRテスト	陰性
⑤	VPテスト	陰性
⑥	インドールの生成	陰性
⑦	硫化水素の生成	陰性
⑧	デンプンの加水分解	陰性
⑨	クエン酸の利用	
	Koser の培地	陰性
	Christensen の培地	陰性
⑩	無機窒素源の利用	
	硝酸塩	陰性
	アンモニウム塩	陽性
⑪	色素の生成	有り (非水溶性)
⑫	ウレアーゼ	陰性
⑬	オキシダーゼ	陽性
⑭	カタラーゼ	陽性
⑮	生育の範囲	
	(1) pH	pH 6 ~ pH10で生育 (最適: pH 8)
	(2) 温度	10℃ ~ 33℃で生育 (最適: 28℃)
⑯	酸素に対する態度	好気性
⑰	O-Fテスト	酸化 (Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを 0.1%添加した。)

【0023】

【表12】

## ⑬ 糖類からの酸およびガスの生成の有無

(Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを 0.1%添加した。)

	酸	ガ ス
(1) L-アラビノース	+	-
(2) D-キシロース	+	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	+	-
(5) D-フラクトース	+	-
(6) D-ガラクトース	+	-
(7) マルトース	+	-
(8) シュークロース	+	-
(9) ラクトース	+	-
(10) トレハロース	+	-
(11) D-ソルビトール	-	-
(12) D-マンニトール	+	-
(13) イノシトール	-	-
(14) グリセリン	+	-
(15) デンプン	-	-

【0024】

【表13】

(d) その他の生理学的性質

① エスクリン分解	陽性
② アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
③ 3-ケトラクトースの生成	陰性
④ PNPG	陽性
⑤ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュクロース	陰性

⑥ 資化性 (API 20NBキットによる)

(1) グルコース	陽性
(2) L-アラビノース	陽性
(3) D-マンノース	陰性
(4) マンニトール	陽性
(5) N-アセチル-D-グルコサミン	陰性
(6) マルトース	陰性
(7) グルコン酸カリウム	陰性
(8) n-カプロン酸塩	陰性
(9) アジピン酸	陰性
(10) dl-リンゴ酸	陽性
(11) クエン酸ナトリウム	陰性
(12) 酢酸フェニル	陰性

【0025】

【表14】

## (e) 化学分類学的性質

① 菌体内DNAのGC含量	66モル%
② キノン系	Q-10
③ バクテリオクロロフィル	
嫌気下での産生	生育せず
好気下での産生	陰性
④ スフィンゴ脂質の存在	陰性
⑤ B-396株とのDNA-DNA相同性 (HPLC法)	相同値56%

【0026】以上の結果からA-581-1株はE-3 96株と同様に下記の性質を具備することおよびE-3 96株とのDNA-DNA相同性が高いことからE-3 96株と同一の新規な属に属する細菌であると判断され

た。

【0027】

【表15】

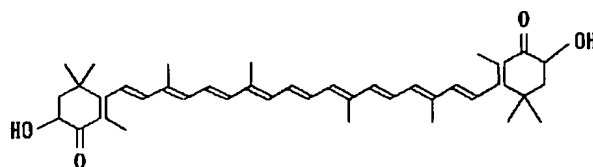
① 形態	多形性の桿菌
② 運動性	有り
③ 鞭毛	周毛
④ 孢子形成	無し
⑤ グラム染色性	陰性
⑥ 色素の生成	陽性 (非水溶性)
⑦ オキシダーゼ	陽性
⑧ カタラーゼ	陽性
⑨ 酸素に対する態度	好気性
⑩ グルコースの発酵性	陰性
⑪ 3-ケトラクトースの生成	陰性
⑫ キノン系	Q-10
⑬ 菌体内 DNAのGC含量	64~69モル%
⑭ スライムの形成	
グルコース	陰性
シュークロース	陰性
⑮ スフィンゴ脂質の存在	陰性
⑯ バクテリオクロロフィルの存在	陰性

【0028】本発明の微生物は例えばカロチノイド系色素を生産できるものであり、カロチノイド色素の製造のために用いることができる。この様なカロチノイドとしては、例えばアスタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロチン、エキネノン、カンタキサンチン及びゼアキ

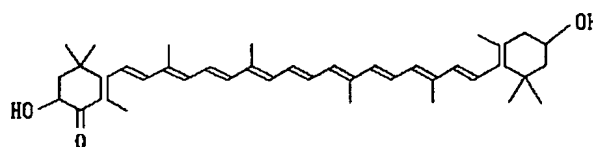
サンチンを挙げることができ、これらのカロチノイドは次の式により表わされる。

【0029】

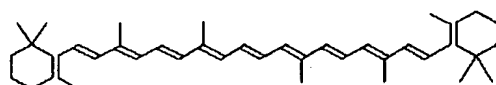
【化1】



アスタキサンチン  
(3, 3' -Dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -Carotene-4, 4' -dione)



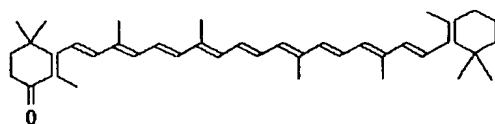
アドニキサンチン  
(3, 3' -Dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -Caroten-4-one)



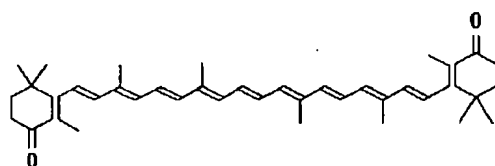
$\beta$ -カロテン  
( $\beta$ ,  $\beta$ -Carotene)

【0030】

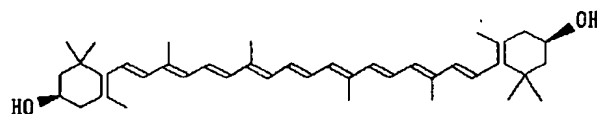
【化2】



エキネノン  
( $\beta$ ,  $\beta$ -Caroten-4-one)



カンタキサンチン  
( $\beta$ ,  $\beta$ -Carotene-4, 4' -dione)



ゼアキサンチン  
((3R, 3'R)- $\beta$ ,  $\beta$ -Carotene-3, 3' -diol)

【0031】カロチノイドを本発明の菌株により製造するための培地は、例えば次の通りである。すなわち、生産菌が生育に必要な炭素源、窒素源、無機塩、および必要であれば特殊な要求物質（例えば、ビタミン、アミノ

酸、核酸塩基等）を含む。炭素源としてはグルコース、シュクロース、ラクトース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトース等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸、ピルビン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール、グリセロール等のアルコール類、大豆油、ヌカ油、オリーブ油、トウモロコシ油、ゴマ油、アマニ油等の油脂類等が挙げられる。添加割合は炭素源の種類により異なるが、通常培地1L当たり1~100g、好ましくは2~50gである。

【0032】窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は窒素源の種類により異なるが、通常培地1Lに対し0.1g~30g、好ましくは1~10gである。無機塩としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸鉄、塩化鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化鉛、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は無機塩の種類により異なるが、通常培地1Lに対し0.001~10gである。

【0033】特殊な要求物質としてはビタミン類、核酸類、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、乾燥酵母、大豆粕、等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は物質の種類により

異なるが、通常、培地1Lに対し0.2g~200g、好ましくは3~100gである。培地のpHは2~12、好ましくは6~9に調整する。培養条件は15~80℃、好ましくは20~35℃の温度であり、通常1日~20日間、好ましくは2~8日間振とう培養あるいは通気攪拌培養を行う。

【0034】最後に培養物より分離精製してカロチノイド色素を得る。すなわち培養物より直接または遠心分離、濾過等により菌体を分離したのち菌体から溶剤で抽出する。また、培養上清にも色素が若干溶解しているので、それらも回収することができる。ここで用いる溶剤はカロチノイド色素が溶解する化合物であればいずれの溶剤を使用することができる。

【0035】例えばアセトン、クロロホルム、ジクロロメタン、ヘキサン、シクロヘキサン、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、ベンゼン、二硫化炭素、ジエチルエーテル等の有機溶剤が用いられ、好ましくはクロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコールが用いられる。精製には吸着、溶出、溶解などの通常の方法を用いることができる。

【0036】本発明の微生物によれば、多くの場合、アスタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン及びゼアキサンチンは同時に生産され、培養物中に共存している。従って、前記の精製法により、前記カロチノイド色素を単独で得ることができる。他方、前記カロチノイド色素を相互に分離することなく、それらを含む混合物として得ることができる。この様に、前記の個々のカロチノイド色素を単独に製造する方法に加えて、前記カロチノイド色素2種類以上を含む混合物としてカロチノイドを製造することも可能である。

【0037】アスタキサンチンとアドニキサンチンの相互分離は、カロチノイド色素成分の相互分離に常用されている方法、例えば吸着分離カラムクロマトグラフィー法、分別抽出法、向流分配抽出法、分別結晶法等を用いて行うことができる。また、個々のカロチノイド色素を製造するためには、培地組成、培養条件等を調整することにより、所望のカロチノイド色素を優先的に生産させることができる。

【0038】例えば、培養における好気性条件を変えることにより、カロチノイド色素の生成量比を変えることができる。例えばフラスコ振とう培養においては液量や振とう速度を変えることにより、また通気・攪拌培養により通気や攪拌条件を変えることによりカロチノイド色素の生成比を変えることができる。一例としてフラスコ振とう培養において、フラスコ当りの液量を増加することによりアスタキサンチンの生成量は増加する傾向にあり、アドニキサンチンの生産量は減少する。

【0039】他の方法として、カロチノイド色素の特定

のものを優先的に製造するためには、生産菌株を変異、例えば人為的変異処理により、一方の成分を他方の成分より優先的に生産するように改良することができる。このような変異処理としては、例えばX線照射、紫外線照射のごとき物理的方法、化学的変異剤、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、エチルメタンスルホネート(EMS)等による変異処理のごとき化学的方法、遺伝子組換え法等の生物学的方法を用いることができる。これらの方法、又は他の方法により改良された生産株も、本発明の微生物に属する。

【0040】前記のごとき方法により製造されたアスタキサンチンは(3S, 3'S)-アスタキサンチンでありその純度はほぼ100%である。天然物であるザリガニ、ヘマトコッカス(*Haematococcus*)、サケ、マス、マダイに存在するアスタキサンチンは(3S, 3'S)体の含有率が高いことが知られている。一方ファフィア・ロドチマ(*Phaffia rhodozyma*)は(3R, 3'R)体の含有率が高く天然に多く存在するアスタキサンチンとは反対の絶対配置を持つことが知られている。

【0041】本微生物により生産したアスタキサンチンは100%の(3S, 3'S)-アスタキサンチンであり天然において多数を締めるアスタキサンチンと同じ絶対配置を有することは産業上価値が高い。また化学合成法による(3S, 3'S)-アスタキサンチンの製造法(Helv.Chim.Acta, 61, 2609, 1978)が知られているが光学活性な(4R, 6R)-4-ヒドロキシ-2, 2, 6-トリメチルシクロヘキサノンを原料とするためコストが高く工業化には問題がある。

【0042】また本微生物により生産したアスタキサンチンはall-trans体のアスタキサンチンの含有率が高いことが特徴でall-trans:cisの比は92:8~96:4である。all-trans体のアスタキサンチンは天然型であり本微生物は天然型のアスタキサンチンを生産する点ですぐれている。cis体のアスタキサンチンが必要であれば公知の方法によりall-trans体から合成できる。しかしcis体からall-trans体のアスタキサンチンを合成することは困難である。

【0043】本発明の微生物により製造される化合物アスタキサンチンの $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトルを図2に、そして質量スペクトルを図3に示す。また、アドニキサンチンの $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトルを図4に、そして質量スペクトルを図5に示す。

【0044】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0045】**実施例1.** 神奈川県緑区の土壌を1gを滅菌生理食塩水5mLに懸濁し、上清を100倍希釈し肉汁

平板寒天培地に塗末し30℃で3日間培養した。オレンジ色の集落を選択した。上記の方法によりE-396株(FERM BP-4283)を取得することができた。この菌株は、前記の菌学的性質を有する。前記の性質からE-396株(FERM BP-4283)は全く新規な属に属する細菌であることが確認された。

【0046】実施例2. 神奈川県緑区の土壌を1gを滅菌生理食塩水5mLに懸濁し、上清を100倍希釈し肉汁平板寒天培地に塗末し30℃で5日間培養した。オレンジ色の集落を選択した。上記の方法によりA-581-1(FERM BP-4671)を取得することができた。この菌株は、前記の菌学的性質を有する。前記の結果からA-581-1株はE-396株と同様の性質を具備することおよびE-396株とのDNA-DNA相同性が高いことからE-396株と同一の新規な属に属する細菌であると判断された。以下、参考例により本発明の細菌の用途を説明する。

【0047】参考例1. グルコース2g/L、肉エキス3g/L、ペプトン10g/L、塩化ナトリウム5g/Lの組成からなる培地10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株(FERM BP-4283)を1白金耳植菌し30℃で6日間、300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液100本分(1L)を遠心分離し得た菌体をアセトン500mLで抽出した後、ヘキサン500mLおよび0.85%食塩水500mLを加え攪拌し、上層を分取した後、溶剤を35℃、減圧下で留去した。

【0048】得られた色素抽出物をシリカゲルのカラムに吸着させ、ベンゼン：酢酸エチル：メタノール(15：4：1)の溶剤でアスタキサンチン画分を溶出させ溶剤を減圧下で留去した。抽出物を少量のピリジンに溶解し水を滴下してアスタキサンチンを結晶化させ、アスタキサンチンの結晶1.2mgを得た。このようにして得られたアスタキサンチンは赤外吸収スペクトル、質量分析、<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル、吸収スペクトルにおいて公知のものと一致した。

参考例2. 表16の組成からなる培地10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。

【0049】

【表16】

	3R, 3' R体	meso体	3S, 3' S体
E-396株生産物	0.0%	0.0%	100.0%
ロシュ社製カロフィルピンク	24.8%	50.2%	25.0%
ザリガニ抽出品	17.6%	28.4%	53.9%

【0054】参考例3. 表16の組成からなる培地(ただしシュクロース30g/L)10mLを直径18mmの

組 成	添 加 量
酵母エキス	20 g/L
シュクロース	10 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01g/L
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.01g/L

pH7.0(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で調整)

【0050】これにE-396株(FERM BP-4283)を1白金耳植菌し30℃で2日間、300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液10mLを上と同組成の培地が100mL入った500mL容量の坂口フラスコに植菌し30℃、2日間、100rpmの往復振とう培養を行った。次にこの培養液100mLを上と同組成の培地が3.0L入った5.0L容量の発酵槽に植菌し30℃、500rpm、1.0vvmの好気培養を52時間行った。

【0051】次にこの培養液3Lを上と同組成(ただし酵母エキス10g/L、シュクロース20g/L、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>2.5g/L)の培地が35L入った50L容量の発酵槽に植菌し30℃、250rpm、1.0vvmの好気培養を18時間行った。得られた培養液33Lを遠心分離し湿菌体790gを得、これをメタノール1.3Lで洗浄し0.8Lのクロロホルムで3回抽出した。色素抽出物からのアスタキサンチンの精製は参考例1と同様の方法により行い、アスタキサンチンの結晶10mgを得た。

【0052】このようにして得られたアスタキサンチンは赤外吸収スペクトル、質量分析、<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル、吸収スペクトルにおいて公知のものと一致した。さらに得られたアスタキサンチンの絶対配置を公知の方法(J.High Resolut.Chromatogr.Chromatogr Commun., 2, 195, 1979)により決定し(3S, 3' S)-アスタキサンチンが100%でありall-trans体とcis体との比は95：5であることが確認された。比較のために他の製法により製造したアスタキサンチンの分析結果を次の表17に示す。

【0053】

【表17】

試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株(FERM BP-4283)を1白金耳



植菌し25℃で5日間、300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液の遠心分離によって得た菌体10mL分をアセトン10mLで抽出した後、ヘキサン10mLおよび0.85%食塩水10mLを加え攪拌し、上層を分取した後溶剤を35℃、減圧下で留去した。

【0055】得られた色素抽出物のカロチノイド量を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ表18のようになった。分析条件は、カラムにWakosil 5SIL-120（和光純薬工業株式会社製）4.6mm I.D.×250mmを二連結して用い、移動相はヘキサ

ン：ジクロロメタン：メタノール（10：8：1）を用いた。カロチノイドの検出は470nmにおける吸収で行い、定量は試料と標準物質のアスタキサンチンとの高速液体クロマトグラフィーにおけるピーク面積比から算出した。さらに得られたアスタキサンチンの絶対配置を参考例2に示した方法で決定し（3S, 3'S）-アスタキサンチンが100%でありall-trans体とcis体との比は95：5であることが確認された。

【0056】

【表18】

アスタキサンチン	アドニキサンチン	総カロチノイド
mg/L	mg/L	mg/L
19.4	13.5	61.9

【0057】参考例4. 表16の組成からなる培地（ただしシュクロース30g/L）10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株（FERM BP-4283）を1白金耳植菌し25℃で2日間300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液を上と同組成の培地が25～200mL入った500mL容量の三角フラスコに1容量%になるよ

うに植菌し25℃、5日間120rpmの回転振とう培養を行った。培養液からのカロチノイドの抽出および分析は参考例3の方法により行ったところアスタキサンチン、アドニキサンチンおよび総カロチノイド量は表19のようになった。

【0058】

【表19】

三角フラスコの 液量 mL	アスタキ サンチン mg/L	アドニキ サンチン mg/L	総カロチノイド mg/L
25	5.6	56.2	63.3
50	16.4	31.5	76.2
100	6.8	20.9	53.4
200	11.6	5.8	34.7

【0059】参考例5. 参考例2で得られた色素抽出物をシリカゲルのカラムに吸着させ、ベンゼン：酢酸エチル：メタノール（15：4：1）の溶剤でアドニキサンチン画分を溶出させ溶剤を減圧下で留去した。抽出物をエタノールに50℃で溶解し4℃で1日間放置することにより結晶化させ、アドニキサンチンの結晶190mgを得た。このようにして得られたアドニキサンチンは赤外吸収スペクトル、質量分析、<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル、吸収スペクトルにおいて公知のものと一致した。

【0060】参考例6. 表16の組成からなる培地（ただしシュクロース30g/L）10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株（FERM BP-4283）を1白金耳植菌し28℃で5日間振とう培養した。この培養液から参考例3の方法によりカロチノイドを抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、ピークの溶出時間、及び各ピークの溶離剤と同じ溶剤中での極大吸収波長は、表20に示す通りであった。なお、この場合の溶出のプロフィールを図6に示す。

【0061】

【表20】

ピークの溶出時間と極大吸収波長

ピーク番号	溶出時間	$\lambda_{max}$
	min	nm
NO. 1	6.0	(428) 456 481
NO. 2	6.3	464
NO. 3	6.8	474
NO. 4	10.4	(426) 455 482

【0062】 $\beta$ -カロテン及びカンタキサンチンについては標準物質を用い、それらの前記と同一条件での溶出時間及び極大吸収波長を測定したところ、これらの測定値はピークNo. 1及びピークNo. 3の測定値とよく一致し、ピークNo. 1は $\beta$ -カロテンを示し、そしてピークNo. 3はカンタキサンチンを示すものと同定された。また、エキネノン及びゼアキサンチンについては、前記の結果と文献（Davies B.H.1976, Carotenoids, 38-165, In T.W.Goodwin(ed.), Chemistry and Biochemistry of

Plant Pigments, Vol.2, Academic Press, Inc. (London), Ltd., London. ] 記載の極大吸収とを比較したところ、ピークNo. 2はエキネノンを示し、そしてピークNo. 4はゼアキサンチンを示すものと同定された。

【0063】参考例7. プレインハートインフュージョン・ブイヨン培地（栄研化学株式会社製、ただし $\text{Na}_2\text{CO}_3$ でpHを10に調整）10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにA-581

-1株（FERM BP-4671）を1白金耳植菌し33℃で4日間振とう培養した。この培養液から参考例3の方法によりカロチノイドを抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより定量分析したところ表21のようになった。

【0064】

【表21】

アスタキサンチン	アドニキサンチン	総カロチノイド
mg/L	mg/L	mg/L
0.30	0.45	0.72

さらに得られたアスタキサンチンの絶対配置を参考例2に示した方法で決定し（3S, 3'S）-アスタキサンチンが100%でありall-trans体とcis体の比は95:5であることが確認された（表22）。

【0065】

【表22】

3R, 3'R体	meso	3S, 3'S体
0.0%	0.0%	100.0%

これにA-581-1株（FERM BP-4671）を1白金耳植菌し28℃で4日間振とう培養した。この培養液から参考例3の方法によりカロチノイドを抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより定量分析したところ表24のようになった。

【0067】

【表24】

参考例8. 表23の組成からなる培地10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。

【0066】

【表23】

組 成	添 加 量
グルコース	10 g/L
ポリペプトン	5 g/L
酵母エキス	5 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
pH8 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で調整)	

アスタキサンチン	アドニキサンチン	総カロチノイド
mg/L	mg/L	mg/L
0.17	0.64	2.81

【0068】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1452

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

配列の種類：rRNAをコードするDNA

AGTTTGATCC TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT AACACATGCA	50
AGTCGAGCGA GACCTTCGGG TCTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACGCGTGG	100
GAACGTGCCC TTCTCTACGG AATAGCCCCG GGAAACTGGG AGTAATACCG	150
TATACGCCCT TTGGGGGAAA GATTATCGG AGAAGGATCG GCCCGCGTTG	200

GATTAGGTAG TTGGTGGGT AATGGCCAC CAAGCCGACG ATCCATAGCT	250
GGTTTGAGAG GATGATCAGC CACTGCGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC	300
CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATCTTAGA CAATGGGGGC AACCTGATC	350
TAGCCATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCA	400
GCTGGGAAGA TAATGACGGT ACCAGCAGAA GAAGCCCCGG CTAACCTCGT	450
GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGGGCT AGCGTTGTTC GGAATTACTG	500
GGCGTAAAGC GCACGTAGGC GGACTGGAAA GTCAGAGGTG AAATCCCAGG	550
GCTCAACCTT GGAAGTGCCT TTGAACTAT CAGTCTGGAG TTCGAGAGAG	600
GTGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA	650
CACCAGTGGC GAAGGCGGCT CACTGGCTCG ATACTGACGC TGAGGTGCGA	700
AAGCGTGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA	750
CGATGAATGC CAGACGTCCG CAAGCATGCT TGTCGGTGTG ACACCTAACG	800
GATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA AACTCAAAGG	850
AATTGACGGG GCGCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGTTT AATTCGAAGC	900
AACGCGCAGA ACCTTACCAA CCCTTGACAT GGCAGGACCG CTGGAGAGAT	950
TCAGCTTTCT CGTAAGAGAC CTGCACACAG GTGCTGCATG GCTGTCTGCA	1000
GCTCGTGTG TGAGATGTTT GGTAAAGTCC GGCAACGAGC GCAACCCACG	1050
TCCCTAGTTG CCAGCAATTC AGTTGGGAAC TCTATGAAA CTGCCGATGA	1100
TAAGTCGGAG GAAGTGTGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG GCCTTACGGG	1150
TTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTGGT ACAGTGGGT AATCCCCAAA	1200
AGCCATCTCA GTTCGATTG TCCTCTGCAA CTCGAGGGCA TGAAGTTGGA	1250
ATCGCTAGTA ATCGCGAAC AGCATGCCG GGTGAATACG TTCCCGGGCC	1300
TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TTGGTCTAC CCGACGACGN	1350
TGCGCTAACC TTCGGGGGGC AGGCGGCCAC GGTAGGATCA GCGACTGGGG	1400
TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC CGTAGGGGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC	1450
TT	1452

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、E-396株と近縁種の系統樹を示す図である。

【図2】図2は、本発明の方法により製造したアスタキサンチンの $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

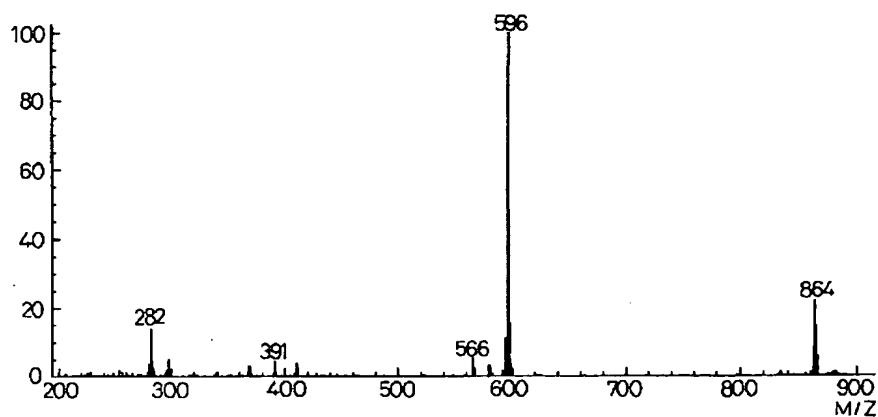
【図3】図3は、本発明の方法により製造したアスタキサンチンの質量スペクトルを示す図である。

【図4】図4は、本発明の方法により製造したアドニキサンチンの $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

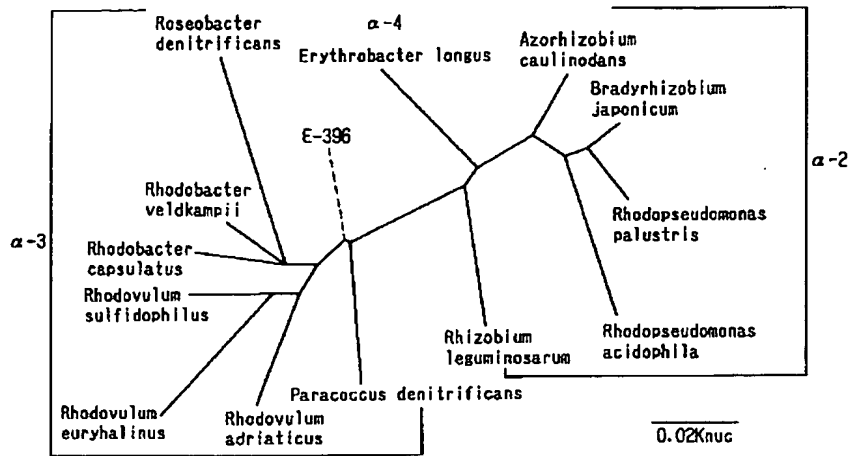
【図5】図5は、本発明の方法により製造したアドニキサンチンの質量スペクトルを示す図である。

【図6】図6は、本発明のカロチノイド色素の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出の様子を示す図である。

【図3】



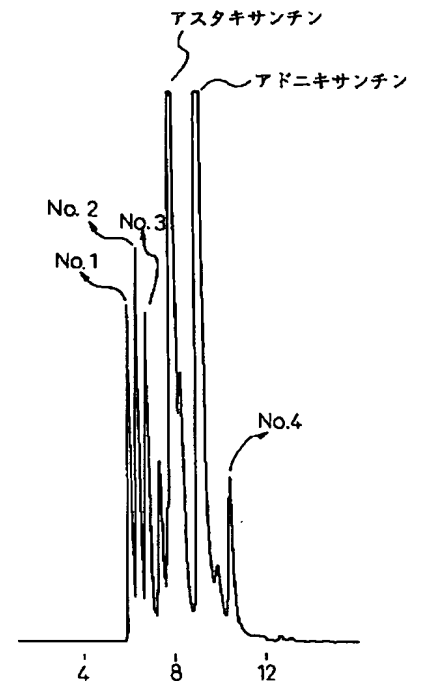
【図1】



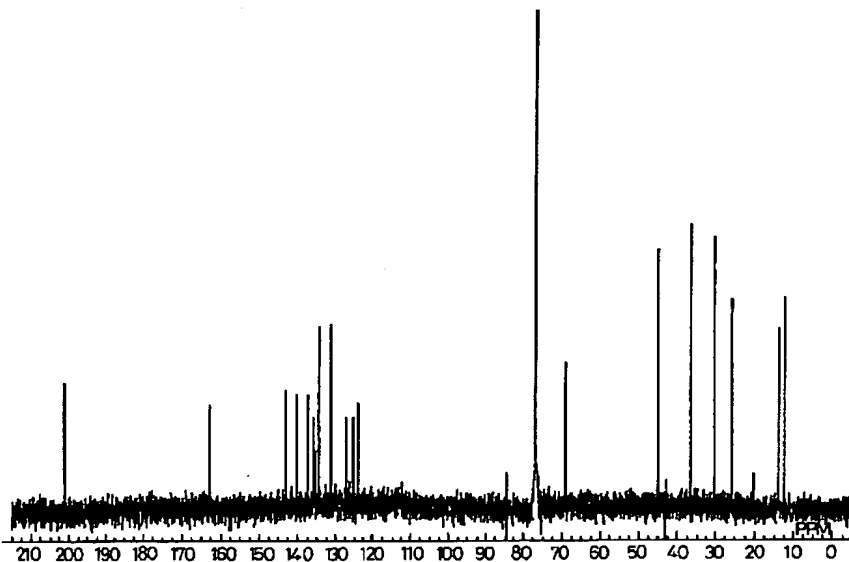
E-396と近縁種の系統樹

$\alpha-2$ ,  $\alpha-3$ ,  $\alpha-4$ はProteobacteriaのsubclassを表わす。

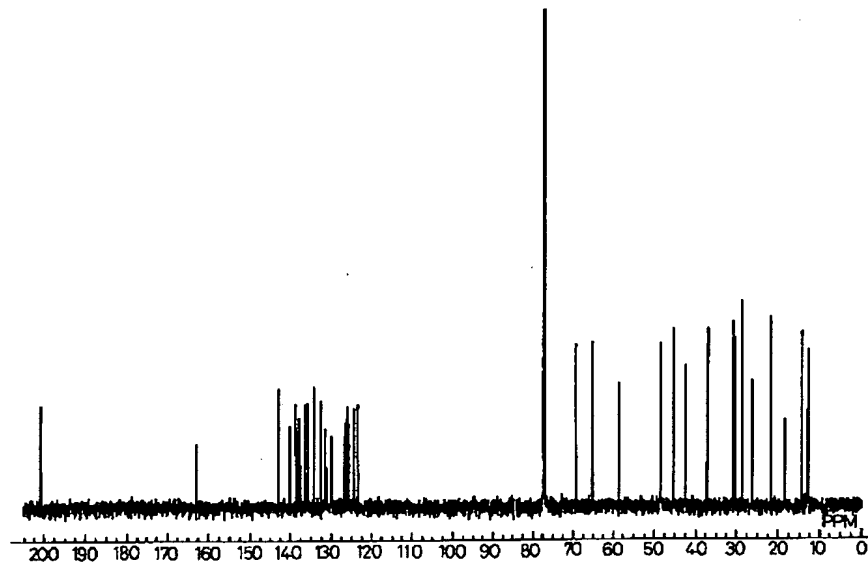
【図6】



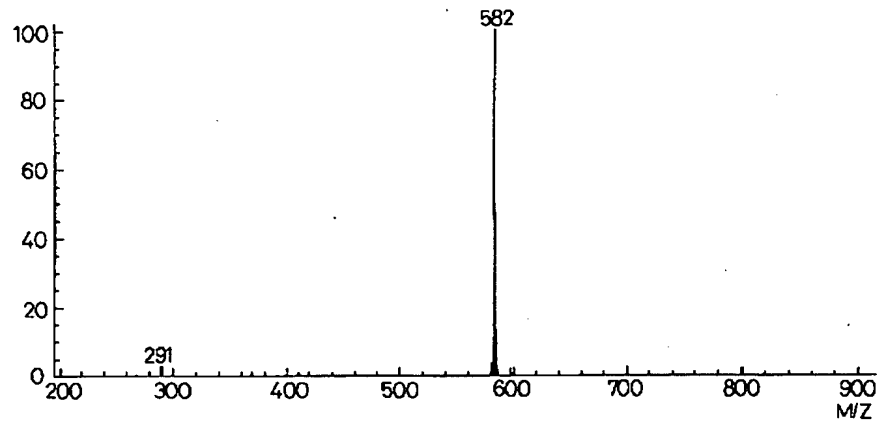
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
C 1 2 R 1:01)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

(72) 発明者 清田 隆  
神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石  
油株式会社中央技術研究所内